

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 15/11, G01N 33/50, A01K 67/00, C12N 1/21, 5/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/35784 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. November 1996 (14.11.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/01818 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Mai 1996 (02.05.96) (30) Prioritätsdaten: 195 16 776.7 10. Mai 1995 (10.05.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JENUWEIN, Thomas [DE/AT]; Barichgasse 21/27, A-1030 Wien (AT). LAIBLE, Götz [DE/AT]; Costagasse 9/13, A-1150 Wien (AT). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: CHROMATIN-REGULATOR GENES (54) Bezeichnung: CHROMATIN-REGULATORGENE (57) Abstract <p>The invention concerns the deregulation of chromatin-regulator genes which have an SET domain, such deregulation being of importance in certain cancer conditions. These genes, in particular the SET domains as such, can be used in the diagnosis and therapy of such conditions.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Deregulation von Chromatinregulatorgenen, die eine SET-Domäne aufweisen, spielt eine Rolle bei bestimmten Krebserkrankungen. Diese Gene können somit, insbesondere die SET-Domäne als solche, als Grundlage für die Diagnose und Therapie dieser Erkrankungen dienen.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Chromatin-Regulatorgene

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Gene, die eine Rolle bei der strukturellen und funktionellen Regulation von Chromatin spielen, und ihre Verwendung für die Therapie und Diagnostik.

Die funktionelle Organisation von eukaryotischen Chromosomen in Centromere, Telomere sowie in eu- und heterochromatische Regionen stellt einen entscheidenden Mechanismus zur Gewährleistung der genauen Replikation und Verteilung der genetischen Information bei jeder Zellteilung dar. Im Gegensatz dazu sind Tumorzellen häufig durch chromosomale Rearrangements, Translokationen und Aneuploidie charakterisiert (Solomon et al., 1991; Pardue, 1991). Obwohl die Mechanismen, die zu einer erhöhten Chromosomeninstabilität in Tumorzellen führen, noch nicht geklärt sind, haben es in jüngster Zeit eine Reihe von experimentellen Systemen, beginnend mit telomerischen Positionseffekten in Hefe (Renauld et al., 1993; Buck und Shore, 1995; Allshire et al., 1994), über Positionseffekt-Variegation (PEV) in *Drosophila* (Reuter und Spierer, 1992), bis zur Analyse von Translokationsbruchpunkten in humanen Leukämien (Solomon et al., 1991; Cleary, 1991), ermöglicht, einige chromosomale Proteine zu identifizieren, die an der deregulierten Proliferation ursächlich beteiligt sind.

Erstens wurde festgestellt, daß die Überexpression einer verkürzten Version des SIR4-Proteins zu einer verlängerten Lebensdauer in Hefe führt (Kennedy et al., 1995). Da SIR-Proteine zum Entstehen multimerer Komplexe an den stillen "Mating Type Loci" und am

Telomer beitragen, könnte es sein, daß überexprimiertes SIR4 mit diesen heterochromatinartigen Komplexen interferiert, was schließlich zu einer unkontrollierten Proliferation führt. Diese Annahme steht im Einklang mit der Häufigkeit des Auftretens einer deregulierten Telomerenlänge in den meisten humanen Krebsarten (Counter et al., 1992).

Zweitens wurden mittels genetischer Analysen von PEV in *Drosophila* eine Reihe von Genprodukten identifiziert, die die Chromatinstruktur an heterochromatischen Positionen und innerhalb des homeotischen Genclusters verändern (Reuter und Spierer, 1992). Mutationen einiger dieser Gene, wie *modulo* (Garzino et al., 1992) und *polyhomeotic* (Smouse und Perrimon, 1990), können in *Drosophila* die deregulierte Zellproliferation oder den Zelltod verursachen. Drittens wurden Säugetierhomologe von sowohl Aktivatoren (*trithorax* oder *trx*-Gruppe) als auch Repressoren (z.B. *polycomb* oder *Pc*-Gruppe) der Chromatinstruktur von homeotischen *Drosophila*-Selektorgenen beschrieben. Unter diesen hat sich vom humanen *HRX/ALL-1* (*trx*-Gruppe) gezeigt, daß es an der durch Translokation induzierten Leukämogenese beteiligt ist (Tkachuk et al., 1992; Gu et al., 1992), und daß die Überexpression des Maus-*bmi* (*Pc*-Gruppe) zum Entstehen von Lymphomen führt (Haupt et al., 1991; Brunk et al., 1991; Alkema et al., 1995). Ein Modell für die Funktion chromosomaler Proteine läßt darauf schließen, daß diese multimere Komplexe bilden, welche in Abhängigkeit von der Ausgewogenheit zwischen Aktivatoren und Repressoren im Komplex den Kondensationsgrad der umliegenden Chromatinregion bestimmen (Locke et al., 1988). Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts durch Überexpression einer der Komponenten des Komplexes zeigte eine Neuverteilung von eu- und heterochromatischen Regionen (Buck und Shore,

1995; Reuter und Spierer, 1992; Eissenberg et al., 1992). Dieser Dosisseffekt kann die Chromatinstruktur an vorbestimmten Loci destabilisieren, was letztlich zu einem Übergang vom normalen zum transformierten Zustand führt.

Trotz der Charakterisierung von *HRX/ALL-1* und *bmi* als Protoonkogene, die die Chromatinstruktur verändern können, ist das Wissen über Säugetiergenprodukte, welche mit Chromatin wechselwirken, noch sehr beschränkt. Im Gegensatz dazu wurden durch genetische Analysen von PEV in *Drosophila* ca. 120 Allele für Chromatinregulatoren beschrieben (Reuter und Spierer, 1992). Kürzlich wurde eine carboxyterminale Region mit Ähnlichkeit in der Sequenz identifiziert, die einem positiven (*trx*, *trx*-Gruppe) und einem negativen (*E(z)*, *Pc*-Gruppe) *Drosophila*-Chromatinregulator (Jones und Gelbart, 1993) gemeinsam ist. Darüberhinaus ist dieser Carboxyterminus auch in *Su(var)3-9*, einem dominanten Suppressor der Chromatinverteilung in *Drosophila*, konserviert (Tschiersch et al., 1994).

Bei der vorliegenden Erfindung wurde von der Überlegung ausgegangen, daß diese als "SET" bezeichnete Proteindomäne (Tschiersch et al., 1994) wegen ihrer evolutionären Konservierung und dem Vorhandensein in antagonistischen Genprodukten eine neue Genfamilie entwicklungsgeschichtlich wichtiger Säugetier-Chromatinregulatoren definiert. Darüberhinaus trägt die Charakterisierung weiterer Mitglieder der Gruppe von SET-Domäne-Genen, neben *HRX/ALL-1*, zur Aufklärung der Mechanismen bei, die dafür verantwortlich sind, daß strukturelle Veränderungen im Chromatin zur malignen Transformation führen können.

Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, humane Chromatinregulatorgene zu identifizieren, ihre Funktion aufzuklären und sie für die Diagnostik und Therapie einzusetzen.

Zur Lösung dieser Aufgabe wurde zunächst die Sequenzinformation der SET-Domäne benutzt, um aus humanen cDNA-Banken die zu den SET-Domäne-Genen von *Drosophila* homologen humanen cDNAs zu erhalten. Es wurden zwei cDNAs erhalten, die Humanhomologe von *E(z)* bzw. *Su(var)3-9* darstellen; die entsprechenden humanen Gene wurden als *EZH2* und *SUV39H* bezeichnet (vgl. unten); außerdem wurde eine variante Form von *EZH2* identifiziert, die als *EZH1* bezeichnet wurde.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit DNA-Moleküle, enthaltend eine für ein Chromatinregulator-Protein, das eine SET-Domäne aufweist, kodierende Sequenz oder eine Teilsequenz davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in Fig. 6 oder in Fig. 7 dargestellte Nukleotidsequenz aufweisen. Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle werden im folgenden auch als "erfindungsgemäße Gene" bezeichnet.

Die erfindungsgemäßen Gene tragen die Bezeichnung *EZH2* und *SUV39H*, sie wurden ursprünglich als "HEZ-2" und "H3-9" bezeichnet.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt die von diesen Genen abgeleiteten cDNAs, einschließlich ihrer degenerierten Varianten; Mutanten, die für funktionelle Chromatinregulatoren kodieren sowie Varianten, die auf eine Genduplikation zurückzuführen sind; ein Beispiel dafür ist *EZH1*, dessen Teilsequenz im Vergleich mit *EZH2* in Fig. 8 dargestellt ist.

Zur Lösung der im Rahmen der vorliegenden Erfindung gestellten Aufgabe wurde im einzelnen wie folgt vorgegangen: Ausgehend von der Sequenzinformation von der konservierten SET-Domäne, wurde unter reduzierter Stringenz eine humane B-Zell-spezifische cDNA-Bibliothek mit einer gemischten *Drosophila*-DNA-Sonde, die für die SET-Domänen von *E(z)* und *Su(var)3-9* kodiert, gescreent. Aus 500.000 Plaques wurden 40 primäre Phagen ausgewählt. Nach zwei weiteren Runden Screening zeigte sich, daß 31 Phagen für authentische *E(z)*-Sequenzen kodieren und daß fünf Phagen *E(z)*-Varianten darstellen. Im Gegensatz dazu hybridisierten nur zwei Phagen mit der Sonde, die die SET-Domäne von *Su(var)3-9* allein enthielt. Die Phageninserts wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und mittels Restriktionskartierung und Teilsequenzierung analysiert. Repräsentative cDNA-Inserts wurden subkloniert und über ihre ganze Länge sequenziert. Die 5'-Enden wurden isoliert, indem positive Phagen noch einmal mit 5'-DNA-Sonden gescreent wurden, worauf nach Subklonierung komplette cDNAs erhalten wurden.

Die komplette, für das humane Homologe von *E(z)* kodierende cDNA wurde als *EZH2* und die DNA, die für das humane Homologe von *Su(var)3-9* kodiert, wurde als *SUV39H* bezeichnet. Insgesamt beträgt die Identität der Aminosäuren zwischen *Drosophila* und den humanen Proteinen 61 % für *EZH2* und 43 % für *SUV39H*, wobei die C-terminale SET-Domäne sehr hoch konserviert ist (88 % für *EZH2* und 53 % für *SUV39H*). Der Sequenzvergleich zeigte weitere deutliche Homologieregionen, z.B. eine Cystein-reiche Domäne in *EZH2* und eine Chromo-Box in *SUV39H*. (In *polycomb* wurde gezeigt, daß die Chromo-Box die für die Wechselwirkung zwischen DNA und Chromatin wesentliche Domäne ist; Messmer et al., 1992). Im Gegensatz dazu fehlen die

207 Aminosäuren, die das aminoterminal GTP-Bindungsmotiv des *Drosophila*-Proteins enthalten, im humanen Homologen *SUV39H*.

Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zwischen den *Drosophila*- und den humanen Genen ist in den Fig. 1 und 2 dargestellt:

Fig. 1 zeigt den Vergleich der Aminosäure-Sequenz zwischen *EZH2* und von *Drosophila Enhancer von zeste* (*E(z)*). Identische Aminosäuren der konservierten carboxyterminalen SET-Domäne (schattierte Box) und der Cys-reichen Region (Cys-Reste sind hervorgehoben) sind gezeigt. Die mutmaßlichen Kernlokalisierungssignale sind unterstrichen.

Fig. 2 zeigt den Vergleich der Aminosäure-Sequenz zwischen dem humanen Homologen *SUV39H* und *Drosophila Su(var)3-9*. Identische Aminosäuren der konservierten carboxyterminalen SET-Domäne (schattierte Box) und der Chromo-Domäne (dunkler schattierte Box) sind dargestellt. Die mutmaßlichen Kernlokalisierungssignale sind unterstrichen. Oben in der Figur ist eine schematische Übersicht der beiden Proteinstrukturen dargestellt, die zeigt, daß im humanen Homologen 207 Aminosäuren am N-Terminus fehlen.

Da translationale Consensussequenzen in Umgebung des Start-ATG der humanen *SUV39H*-cDNA auch an der entsprechenden internen Position in *Su(var)3-9* vorhanden sind, dürfte das *Drosophila*-Protein zusätzliche Exons enthalten, die in einem späteren Stadium der Evolution für die Funktion entbehrlich wurden. (Die Richtigkeit dieser Hypothese kann bestätigt werden, indem die humane *SUV39H*-cDNA und komplette oder am 5'-Ende verkürzte cDNAs von

Su(var)3-9 in *Drosophila* exprimiert werden. Darüberhinaus wurde eine weitere cDNA der Bezeichnung MG-44 beschrieben (s. unten), der ebenfalls das 5'-Ende des *Drosophila*-Gens fehlt.) Zusätzlich zur humanen cDNA von *SUV39H* wurde auch der homologe Locus in der Maus (*Suv39h*; siehe unten) isoliert, dessen Sequenzanalyse und Promotorstruktur eindeutig die aminoterminalen Verkürzung säugerhomologer Gene im Vergleich zu *Drosophila Su(var)3-9* bestätigt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführte DNA-Blot-Analysen deuten darauf hin, daß säugerhomologe Gene von *Su(var)3-9* in der Maus und im Menschen von einzelnen Loci repräsentiert werden, während säugerhomologe Gene von *E(z)* in der Maus und im Menschen durch zwei getrennte Loci kodiert sind. Der zweite humane Locus (als *EZH1* bezeichnet) wurde auch durch Charakterisierung einer kleinen Anzahl von cDNA-Varianten, die sich in ihren 3'-flankierenden Sequenzen von der Mehrzahl der aus der humanen cDNA-Bibliothek isolierten Klone unterscheiden, bestätigt. Die Unterschiede zwischen *EZH2* und *EZH1* im sequenzierten Bereich sind in Fig. 8 dargestellt: Die SET-Domäne von *EZH1* zeigt gegenüber *EZH2* Mutationen; außerdem trägt die von uns isolierte *EZH1*-Variante (sehr wahrscheinlich eine aberrant gespleißte cDNA) ein sich im Leserahmen befindliches Stopcodon, welches das Protein um die 47 C-terminalen Aminosäuren verkürzt. In Fig. 8 ist die Nukleotidsequenz der *EZH2*-cDNA von Position 1844 bis 2330 in der jeweils oberen Zeile dargestellt, wobei die 5' Spleißstelle und das potentielle Stopcodon unterstrichen sind. Um eine Teilsequenz der cDNA der *EZH1*-Variante der *EZH2*-Sequenz zuzuordnen, wurde das gap-Programm des Wisconsin GCG Netzwerkservice verwendet. Das vorzeitige Stopcodon in

EZH1 (Position 353) ist unterstrichen. Sequenzen, die für die konservierte SET-Domäne kodieren, sind hervorgehoben. Außerdem ist das 3'-Ende (Position 151 in *EZH1*) des aberranten Transkripts *B52* (s. unten) dargestellt. Über die verfügbare Sequenz zeigte sich *B52* zu 97 % identisch mit *EZH1* und zu 72 % identisch mit *EZH2*. Der Sequenzvergleich von *EZH1* mit *EZH2* sowie die Feststellung, daß beim Menschen und der Maus zwei getrennte *E(z)*-homologe Loci auftreten, lassen darauf schließen, daß bei Säugern eine Genduplikation aufgetreten ist.

In einem Vergleich mit cDNA-Sequenzen in der Datenbank GeneBank wurde überraschend festgestellt, daß bestimmte in der Datenbank eingetragene cDNA-Teilsequenzen, die von aberranten Transkripten in Tumorgeweben abgeleitet sind, mutierte Versionen der erfindungsgemäßen cDNAs darstellen:

Einerseits war auf der Suche nach *BRCA1*, einem Gen, das für Brust- und Eileiterkrebs prädisponiert, eine partielle cDNA-Sequenz mit 271 Nukleotiden der Bezeichnung *B52*, die für eine mutierte Variante der SET-Domäne kodiert, isoliert und auf dem humanen Chromosom 17q21 kartiert worden (Friedman et al., 1994). Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschend festgestellt, daß *B52* 97 % Identität mit der erfindungsgemäßen *EZH1*-cDNA-Variante aufweist (vgl. oben); möglicherweise stellt *EZH1* ein Gen dar, dessen Reaktivierung bei der deregulierten Proliferation eine Rolle spielt.

Andererseits war eine cDNA (2.800 Nukleotide; *MG-44*) vom humanen Chromosom Xp11 isoliert worden (Geraghty et al., 1993), einer Region, die für degenerative Störungen der Netzhaut und Synovialsarkome

prädisponiert. Es wurde überraschend festgestellt, daß diese cDNA 98 % Identität mit der erfindungsgemäßen SUV39H-cDNA aufweist.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung bereitgestellten neuen Gene ermöglichen es somit, einen Zusammenhang zwischen bestimmten Krebserkrankungen und Mutationen in Chromatinregulatoren herzuleiten; im Falle der MG-44-cDNA konnte, da diese mehrere Punkt- und Frameshift-Mutationen aufweist, welche die Chromo- und SET-Domänen unterbrechen, erst anhand der erfindungsgemäßen SUV39H-cDNA ein Zusammenhang zwischen Su(var)3-9 und MG-44 aufgeklärt werden.

Neben den bereits genannten Sequenzen sind in der Sequenzdatenbank GeneBank als weitere humane Mitglieder der SET-Proteinfamilie das gut dokumentierte humane Homologe von *Drosophila* *trx*, *HRX/ALL-1* (Tkachuk et al., 1992; Gu et al., 1992) eingetragen, ferner ein Gen unbekannter Funktion der Bezeichnung *G9a*, das im humanen Major Histocompatibility Complex (Milner und Campbell, 1993) vorhanden ist, drittens eine nicht publizierte cDNA (*KG-1*), die aus unreifen myeloiden Tumorzellen isoliert wurde (Nomura et al., 1994). Während *G9a* derzeit das einzige humane Gen mit einer SET-Domäne ist, für das bisher keine mutierte Version bekannt ist, trägt *KG-1* eine Insertion von 342 Aminosäuren, welche die SET-Domäne in eine Amino- und eine Carboxyterminale Hälfte spaltet. Wahrscheinlich stellt diese *KG-1*-cDNA eine aberrant gespleißte Variante dar, da sich 5' und 3' Konsensus-Spleißstellen an beiden Enden der Insertion finden. Insgesamt sind vier der fünf derzeit bekannten humanen Mitglieder der SET-Proteinfamilie Änderungen unterworfen, die alle die SET-Domäne mutieren (*HRX/ALL-1*, *EZH1/B52*, *SUV39H/MG-44*

und KG-1). Darüberhinaus wurden in drei Fällen die entsprechenden humanen Genloci in der Nähe von Translokationsbruchpunkten oder instabilen chromosomalen Regionen kartiert (HRX/ALL-1, EZH1/B52 und SUV39H/MG-44). In Fig. 3 sind die aberranten Transkripte von humanen SET-Domäne-Genen dargestellt. Links in der Figur ist die Lage der fünf derzeit bekannten SET-Domäne-Gene auf dem jeweiligen Chromosom angegeben. U.a. sind die drei Gene (HRX/ALL-1, EZH1/B52 und SUV39H/MG-44), für die aberrante cDNAs auf Translokationsbruchpunkten oder instabilen Chromatinregionen kartiert wurden, dargestellt. Vier der fünf dargestellten SET-Domänen Gene weisen Mutationen auf, die alle die Carboxyterminale SET-Domäne unterbrechen, welche in der Figur durch die dunkle Box dargestellt ist. Eine Translokation verbindet die aminoternale Hälfte von HRX mit einer nicht korrelierten Gensequenz, die als gepunktete Box mit der Bezeichnung ENL dargestellt ist. Mutationen und ein vorzeitiges Stopcodon verändern die SET-Domäne von EZH1/B52. Punkt- und Frameshift-Mutationen unterbrechen die Chromo- und SET-Domäne in MG-44. Eine große Insertion spaltet die SET-Domäne von KG-1 in zwei Hälften. Aberrante Transkripte sind derzeit für G9a nicht bekannt. Das Cystein-reiche Cluster in B52 ist als gepunktete Box dargestellt; in HRX/ALL-1 sind die Homologieregion zu Methyltransferasen als schraffierte Box und die A/T-Haken als vertikale Linien dargestellt. Die Namen der jeweiligen authentischen Gene sind rechts in der Figur angegeben.

Die Tatsache, daß ein Säugetiergen der SET-Proteinfamilie, HRX/ALL-1, mit translokations-induzierter Leukämogenese im Zusammenhang gebracht wurde (Tkachuk et al., 1992; Gu et al., 1992), ist ein starker Hinweis dafür, daß Proteine mit der SET-Domäne

nicht nur wichtige Regulatoren der Entwicklung sind, die chromatinabhängige Veränderungen der Genexpression mitbestimmen, sondern daß sie, nach Mutation, auch die normale Zellproliferation stören.

Da alle bisher beschriebenen Mutationen die Primärstruktur der SET-Domäne unterbrechen, liegt die Vermutung nahe, daß es die SET-Domäne als solche ist, die eine entscheidende Rolle im Übergang vom normalen zum transformierten Zustand spielt. Eine wichtige Funktion für die SET-Domäne kann ferner aufgrund ihrer evolutionären Konservierung in Genprodukten, die von der Hefe bis zum Menschen auftreten, vermutet werden.

Fig. 4 zeigt die evolutionäre Konservierung von SET-Domäne-Proteinen: Unter Verwendung des tfasta-Programms des Wisconsin GCG Netzwerkservice wurden Proteine und offene Leserahmen mit Homologie zur SET-Domäne identifiziert. In der Figur ist eine repräsentative Auswahl von Hefe bis zum Menschen gezeigt. Ziffern geben Aminosäuren an. Die Carboxyterminale SET-Domäne ist durch eine schwarze Box dargestellt, Cys-reiche Regionen durch eine dunkel gepunktete Box, das GTP-Bindungsmotiv in *Su(var)3-9* durch eine hellgepunktete Box und die Chromo-Domäne von *Su(var)3-9* und *H3-9* durch eine offene Box mit hellen Punkten. Eine Region mit Homologie zu Methyltransferase (*trx* und *HRX*) ist als schraffierte Box dargestellt. A/T-"Haken" ("A/T Hooks") sind durch vertikale Linien dargestellt. Eine weitere Ser-reiche Region (S in C26E6.10) und eine Glu-reiche Region (E in *G9a*) oder Ankyrin-Repeats (ANK in *G9a*) sind ebenfalls hervorgehoben. YHR119 (GeneBank Accession No. U00059) und C26E6.10 (GeneBank Accession No. U13875) sind offene Leserahmen von kürzlich in die Datenbank eingetragenen Cosmiden ohne eine funktionelle Charakterisierung. Prozente geben die Gesamtheit der

Aminosäure-Identitäten zwischen den humanen und den *Drosophila*-Proteinen an.

Fig. 5 zeigt die Übereinstimmung an Aminosäuren der SET-Domäne. Die SET-Domäne der in Fig. 4 dargestellten Gene wurde unter Verwendung des Pileup-Programms des Wisconsin GCG Netzwerkservice angeordnet. Für den Vergleich der KG-1-SET-Domäne wurde vor dem Pileup die große Aminosäure-Insertion, die die SET-Domäne in zwei Hälften spaltet, entfernt. Aminosäure-Positionen, die 8 von 10 Übereinstimmungen aufweisen, sind hervorgehoben.

Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellten Kriterien erweist sich eine Beteiligung der Gene, die eine SET-Domäne haben, an der chromatinabhängigen Entstehung der deregulierten Proliferation; diese Gene bzw. die davon abgeleiteten cDNAs sowie Teil- und mutierte Sequenzen können somit bei der Therapie und Diagnose von Erkrankungen, die auf eine derartige Proliferation zurückzuführen sind, eingesetzt werden:

Unterschiede im Transkriptionsniveau von SET-Domäne-RNAs zwischen normalen und transformierten Zellen können als diagnostischer Parameter für Erkrankungen herangezogen werden, in denen die Expression von SET-Domäne-Genen dereguliert ist:

So können Oligonukleotide, kodierend für die SET-Domäne als solche bzw. Teilabschnitte davon, als diagnostischer Marker verwendet werden, um bestimmte Krebsarten, in denen die SET-Domäne mutiert ist, zu diagnostizieren. Für die detaillierte Analyse der Funktion der erfindungsgemäßen cDNAs oder Abschnitten davon im Hinblick auf den diagnostischen Einsatz von

SET-Domäne-Gensequenzen wurden im Rahmen der vorliegenden Erfindung die homologen Maus-cDNAs von *EZH1* (*Ezh1*) und *SUV39H* (*Suv39h*) isoliert. Bei Verwendung einer Maus-spezifischen, für die SET-Domäne kodierenden, DNA-Sonde in "RNase protection" Analysen zur Untersuchung der *Ezh1*-Genaktivität während der normalen Mausentwicklung zeigte sich ein eher breites Expressionsprofil, das ähnlich dem von *bmi* (Haupt et al., 1991) ist. Die mit den Maussequenzen durchgeführten Analysen werden mit Humansequenzen ausgeweitet, um die RNA-Mengen zwischen unreifen Vorläuferzellen, Tumorzellen und differenzierten Zellen in verschiedenen humanen Zellkultursystemen zu vergleichen. Um festzustellen, ob sich die SET-Domäne dementsprechend als diagnostischer Tumormarker für spezifische Krebserkrankungen oder als genereller diagnostischer Parameter eignet, können gängige Methoden zur Bestimmung der RNA-Konzentration, die in einschlägigen Laborhandbüchern (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben sind, wie Northern Blot, S1-Nuclease-Protection-Analyse oder RNase-Protection-Analyse, verwendet werden.

Um die Häufigkeit zu untersuchen, mit der die SET-Domäne spezifischen Mutationen unterliegt, können die SET-spezifischen DNA-Sonden zur Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (single strand conformation polymorphisms; SSCP; Gibbons et al., 1995) eingesetzt werden.

Krebsarten, bei denen SET-spezifische DNA-Sonden als diagnostischer Marker verwendet werden können, sind Brustkrebs (*EZH1*; Friedman et al., 1994), Synovialksarkom (*SUV39H*; Geraghty et al.; 1993) und Leukämien.

Aufgrund der Kenntnis der Nukleotidsequenz der SET-Domäne-Gene können die entsprechenden von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Proteine, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, in rekombinanter Form hergestellt werden, indem die dafür kodierenden cDNAs in geeignete Vektoren inseriert und in Wirtsorganismen exprimiert werden. Die für die Produktion rekombinanter Proteine verwendeten Techniken sind dem Durchschnittsfachmann geläufig und können einschlägigen Handbüchern (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) entnommen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit in einem weiteren Aspekt rekombinante DNA-Moleküle, enthaltend die für *EZH2*, *SUV39H* oder *EZH1* kodierende DNA sowie damit funktionell verbundene Expressionskontrollsequenzen, sowie die damit transformierten Wirtsorganismen.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine können eingesetzt werden, um die Wechselwirkung von SET-Domäne-Proteinen mit Chromatin bzw. mit anderen Mitgliedern von Heterochromatinkomplexen zu analysieren; ausgehend von den dabei erhaltenen Erkenntnissen über die Wirkungsweise dieser Komplexe werden die sich im einzelnen ergebenden Möglichkeiten für das gezielte Eingreifen in die daran beteiligten Mechanismen definiert und können für therapeutische Anwendungen genutzt werden.

Untersuchungen, die der weiteren Analyse der Funktion der SET-Domäne dienen, werden z.B. durchgeführt, indem cDNAs, kodierend für humanes *EZH2* bzw. *SUV39H* und versehen mit einem Epitop, gegen das Antikörper zur

Verfügung stehen, *in vitro* sowie in Gewebekulturen exprimiert werden. Nach Immunpräzipitation mit den jeweiligen epitopspezifischen Antikörpern kann festgestellt werden, ob *EZH2* und *SUV39H* miteinander *in vitro* wechselwirken können und ob *in vivo* eine Komplexbildung zwischen *EZH2* und/oder *SUV39H* mit weiteren Chromatinregulatoren stattfindet.

Es wurde bereits von anderen Autoren angenommen (DeCamillis et al., 1992; Rastelli et al., 1993; Orlando und Paro, 1993), daß eine Komplexbildung zwischen verschiedenen Mitgliedern von Heterochromatinproteinen wesentlich für deren Funktion ist. Aufgrund der Verfügbarkeit der erfindungsgemäßen SET-Domäne-Gene kann festgestellt werden, ob die SET-Region eine Domäne darstellt, die aufgrund von Wechselwirkungen funktioniert, oder ob sie zum Entstehen multimerer heterochromatischer Komplexe beiträgt. Ebenso kann festgestellt werden, ob die SET-Domäne eine inhibitorische Funktion hat, ähnlich der aminoterminalen BTB-Domäne verschiedener Chromatinregulatoren, einschließlich des GAGA-Faktors (Adams et al., 1992). Insgesamt erlauben die Analysen von Wechselwirkungen mit Epitop-versehenen *EZH2*- und *SUV39H*-Proteinen eine weitere Charakterisierung der Funktion der SET-Domäne. Dadurch werden Möglichkeiten eröffnet, gegen die deregulierte Aktivität vorzugehen, indem z.B. mittels gentherapeutischer Methoden dominant-negative Varianten der SET-Domäne-cDNA-Sequenzen in die Zelle eingeführt werden. Derartige Varianten werden z.B. erhalten, indem zunächst die funktionellen Domänen der SET-Proteine definiert werden, z.B. die für die DNA/Chromatin- oder die für die Protein/Protein-Wechselwirkung verantwortlichen Sequenzabschnitte, und indem dann die um die jeweilige(n) Domäne(n) oder um Abschnitte davon

verkürzten DNA-Sequenzen in der betroffenen Zelle zur Expression gebracht werden, um eine durch das intakte funktionelle Protein verursachte Deregulation der Proliferation zu kompetitieren.

Die Verfügbarkeit der erfindungsgemäßen cDNAs erlaubt ferner die Herstellung transgener Tiere, z.B. Mäuse, in denen SET-Domäne-Gene entweder überexprimiert werden können ("gain-of-function") oder in denen diese Gene ausgeschaltet werden können ("loss-of-function"); für letztere Analysen werden die korrespondierenden Tiersequenzen, insbesondere Mausequenzen, der erfindungsgemäßen Gene eingesetzt. Diese Mäuse sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Insbesondere gibt die "gain-of-function"-Analyse, bei der Allele der erfindungsgemäßen Gene in die Maus eingeführt werden, letztlich Aufschluß über die ursächliche Beteiligung von *EZH2* und *SUV39H* an der chromatinabhängigen Förderung der Tumorentstehung. Für die "gain-of-function"-Analyse können die kompletten cDNA-Sequenzen von humanem *EZH2* und *SUV39H* sowie deren mutierte Versionen, wie *EZH1/B52* und *MG-44*, mittels Vektoren, die hohe Expressionsraten ermöglichen, z.B. Plasmiden mit dem humanen β -Actin-Promotor, getrieben sowohl vom Enhancer der schweren Kette von Immunglobulinen ($E\mu$) als auch von Moloney-Virus-Enhancern (Mo-LTR). Kürzlich wurde gezeigt, daß die $E\mu$ /Mo-LTR-abhängige Überexpression des *bmi*-Gens, welches gemeinsam mit *EZH2* zur Pc-Gruppe negativer Chromatinregulatoren zählt, ausreicht in transgenen Mäusen Lymphome zu erzeugen (Alkema et al., 1995).

Indem in "loss-of-function"-Analysen die endogenen Maus-Loci für *Ezh1* und *Suv39h* durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen unterbrochen

werden, kann bestimmt werden, ob der Verlust der *in vivo*-Genfunktion zu einer abnormalen Entwicklung der Maus führt.

Aufgrund dieser *in vivo*-Systeme kann die Wirkung von *EZH2* und *SUV39H* bestätigt werden; diese Systeme dienen außerdem als Grundlage für Tiermodelle im Hinblick auf eine humane Gentherapie.

Der gentherapeutische Einsatz der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder davon abgeleiteter Sequenzen (z.B. komplementärer Antisenseoligonukleotide) erfolgt - je nachdem, ob die zu behandelnde Erkrankung auf eine Deregulation von Chromatin infolge des Fehlens der funktionellen Gensequenz, oder aber infolge einer Überexpression der entsprechenden Gene zurückzuführen ist - durch Einführung der funktionellen Gensequenz, durch Inhibierung der Genexpression, z.B. mit Hilfe von Antisenseoligonukleotiden, oder durch Einführung einer für eine dominant-negative Mutante kodierenden Sequenz. Die Einführung der jeweiligen DNA-Sequenzen in die Zelle kann mit Hilfe von Standardmethoden für die Transfektion höherer eukaryotischer Zellen erfolgen, zu denen der Gentransfer mittels viraler Vektoren (Retrovirus, Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus) oder mittels nicht-viralen Systemen auf Basis der Rezeptor-vermittelten Endozytose zählen; Übersichten über gebräuchliche Methoden werden z.B. von Mitani und Caskey, 1993; Jolly, 1994; Vile und Russel, 1994; Tepper und Mule, 1994; Zatloukal et al., 1993, WO 93/07283 gegeben.

Für eine Inhibierung der Expression der erfindungsgemäßen Gene kommen auch niedermolekulare Substanzen in Betracht, die in die Transkriptionsmaschinerie eingreifen; nach Analyse der

5'-regulatorischen Region der Gene kann nach Substanzen gescreent werden, die die Wechselwirkung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren mit dieser Region ganz oder teilweise blockieren, z.B. mit Hilfe der in der WO 92/13092 beschriebenen Methode.

Eine Inhibierung der deregulierten Proliferation kann auch am Genprodukt ansetzen, indem die entsprechenden Antikörper gegen das *EZH2*- oder *SUV39H*-Protein, vorzugsweise humane oder humanisierte Antikörper, therapeutisch eingesetzt werden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt nach bekannten Methoden, wie sie z.B. von Malavsi und Albertini, 1992, oder von Rhein, 1993, beschrieben wurden.

Antikörper gegen *EZH2* oder *SUV39H*, die therapeutisch oder diagnostisch verwendet werden können, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Figurenübersicht

- Fig. 1: Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen *EZH2* und *E(z)*
- Fig. 2: Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen *SUV39H* und *Su(var)3-9*
- Fig. 3: Aberrante Transkripte von humanen SET-Domäne-Genen
- Fig. 4: Evolutionäre Konservierung von SET-Domäne-Proteinen
- Fig. 5: Aminosäure-Übereinstimmung in der SET-Domäne
- Fig. 6: DNA- und Aminosäure-Sequenz von *EZH2*
- Fig. 7: DNA- und Aminosäure-Sequenz von *SUV39H*
- Fig. 8: partieller Sequenzvergleich zwischen den cDNAs von humanem *EZH2* und *EZH1*

Beispiel

a) Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Es wurde eine humane B-Zell-spezifische cDNA-Bibliothek, wie von Bardwell und Treisman, 1994, beschrieben, hergestellt, indem Poly(A)⁺-RNA aus humanen BJA-B-Zellen isoliert, mittels Poly(dT)₁₅-Priming revers transkribiert und in doppelsträngige cDNA konvertiert wurde. Nach Zugabe eines EcoRI-Adapters der Sequenz 5' AATTCTCGAGCTCGTCGACA wurde die cDNA in die EcoRI-Stelle des Bakteriophagen gt10 ligiert. Die Propagierung und Amplifizierung der Bibliothek erfolgte in E.coli C600.

b) Herstellung von DNA-Sonden

Drosophila-DNA-Sonden, kodierend für die konservierten SET-Domänen von *E(z)* und *Su(var)3-9*, wurden auf der Grundlage der publizierten *Drosophila*-Sequenzen (Jones und Gelbart, 1993; Tschiersch et al., 1994) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt: 1 µg von *Drosophila melanogaster*-DNA (Clontech) wurde mit den beiden Primern *E(z)* 1910

(5' ACTGAATTCGGCTGGGGCATCTTTCTTAAGG) und *E(z)* 2280

(5' ACTCTAGACAATTTCCATTTACGCTCTATG) einer PCR-

Amplifikation (35 Zyklen zu 30 sek bei 94°C, 30 sek bei 55°C und 30 sek bei 72°C) unterworfen. Die

entsprechende SET-Domäne-Sonde für *Su(var)3-9* wurde von 10 ng Plasmid-DNA (Tschiersch et al., 1994; Klon M4)

mit dem Primerpaar *suvar.up*

(5' ATATAGTACTTCAAGTCCATTCAAAGAGG) und *suvar.dn*

(5' CCAGGTACCGTTGGTGCTGTTAAGACCG) amplifiziert, wobei

dieselben Zyklusbedingungen verwendet wurden. Die

erhaltenen SET-Domäne-DNA-Fragmente wurden Gel-

gereinigt und teilsequenziert, um die Richtigkeit der amplifizierten Sequenzen zu bestätigen.

c) Screenen der cDNA-Bibliothek

5×10^5 Plaque-bildende Einheiten ("plaque forming units", pfu) wurden mit 5 ml Kultur des bakteriellen Wirtsstammes E.coli C600 (bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.5 in 10 mM MgSO₄ suspendiert) bei 37°C 15 min lang inkubiert und dann auf eine große (200 mm x 200 mm) vorgewärmte LB-Schale ausgegossen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C wurden die Phagen auf einer Nylonmembran (GeneScreen) absorbiert. Die Membran wurde, die Seite mit den absorbierten Phagen nach oben schauend, 30 sek lang in Denaturierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) schwimmen gelassen, dann 60 sek in Denaturierungslösung eingetaucht und abschließend 5 min lang in 3 M NaCl, 0.5 M Tris pH 8, neutralisiert. Dann wurde die Membran kurz in 3xSSC gespült und die Phagen-DNA mittels UV-Vernetzung auf das Nylonfilter fixiert. Das Filter wurde 30 min lang bei 50°C in 30 ml Church-Puffer (1 % BSA, 1 mM EDTA und 0.5 M NaHPO₄, pH 7.2) prähybridisiert, anschließend wurden 2×10^6 cpm der radioaktiv markierten DNA-Sondenmischung (E(z)-SET und Su(var)3-9-SET) zugegeben; die DNA-Sonden wurden durch Random-priming unter Verwendung des RediPrime-Kit (Amersham) hergestellt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 50°C durchgeführt. Nach Entfernung der Hybridisierungslösung wurde das Filter 10 sek in 2xSSC, 1 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend wurde 10 sek lang bei 50°C gewaschen. Das Filter wurde in Saranwrap gewickelt und unter Verwendung einer Verstärkerfolie der Autoradiographie unterworfen.

Positive Phagenkolonien wurden auf der Originalplatte mittels Zuordnung des Autoradiogramms identifiziert und

die entsprechenden Agarstückchen mit dem größeren Ende einer Pasteur-Pipette entfernt. Der Phagen-Pool wurde über Nacht bei 4°C in 1 ml SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄-H₂O, 50 ml Tris pH 7.5, 5 ml 2 %ige Gelatine auf 1 l H₂O), enthaltend einige Tropfen CHCl₃, eluiert. Das Phagenlysat wurde für eine zweite und dritte Screeningrunde wieder ausplattiert um einzelne, gut isolierte positive Plaques (20 bis 100 Plaques pro Platte in der dritten Runde) zu erhalten.

d) Sequenzanalyse

Die cDNA-Inserts von rekombinanten Phagen wurden in den Polylinker von pBluescript KS (Stratagene) subkloniert und auf einem automatischen Sequenzer (Applied Biosystems) unter Verwendung der Didesoxy-Methode sequenziert. Die komplette Sequenz von wenigstens zwei unabhängigen Isolaten pro erhaltenen Gen wurde mittels "Primer walking" ermittelt. Die Sequenzen wurden mit dem GCG-Software-Paket (University of Wisconsin) analysiert, die Untersuchung auf Homologie wurde mit dem "Blast and fasta" oder "tfasta" Netzwerkservice durchgeführt. Die kompletten Sequenzen von EZH2 und SUV39H sind in Fig. 6 und 7 dargestellt.

Literatur

- Adams et al., 1992, Genes & Dev. 6, 1589-1607.
Alkema et al., 1995, Nature 374, 724-727.
Allshire et al., 1994, Cell 76, 157-169.
Bardwell und Treisman, 1994, Genes & Dev. 8, 1644-1677.
Brunk et al., 1991, Nature 353, 351-355.
Buck und Shore, 1995, Genes & Dev. 9, 370-384.
Cleary, 1991, Cell 66, 619-622.
Counter et al., 1992, Embo J. 11, 1921-1928.
DeCamillis et al., 1992, Genes & Dev. 6, 223-232.
Eissenberg et al., 1992, Genetics 131, 345-352.
Friedman et al., 1994, Cancer Research 54, 6374-6382.
Garzino et al., 1992, Embo J. 11, 4471-4479.
Geraghty et al., 1993, Genomics 16, 440-446.
Gibbons et al., 1995, Cell 80, 837-845.
Gu et al., 1992, Cell 71, 701-708.
Haupt et al., 1991, Cell 65, 753-763.
Jolly, D., 1994, Cancer Gene Therapy 1, 51.
Jones und Gelbart, 1993, MCB 13 (10), 6357-6366.
Kennedy et al., 1995, Cell 80, 485-496.
Locke et al., 1988, Genetics 120, 181-198.
Malavsi, F. und Albertini, A., 1992, TIBTECH 10, 267-269.
Messmer et al., 1992, Genes & Dev. 6, 1241-1254.
Milner und Campbell, 1993, Biochem. J. 290, 811-818.
Mitani, K. und Caskey, C.T., 1993, Trends in Biotechnology 11, 162-166.
Nomura et al., 1994, Unpublished. GeneBank accession number: D31891.
Orlando und Paro, 1993, Cell 75, 1187-1198.
Pardue, 1991, Cell 66, 427-431.
Rastelli et al., 1993 Embo J. 12, 1513-1522.
Renauld et al., 1993, Genes & Dev. 7, 1133-1145.
Reuter und Spierer, 1992, BioEssays 14, 605-612.
Rhein, R., 1993, The Journal of NIH Res. 5, 40-46.

- Smouse und Perrimon, 1990, Dev. Biol. 139, 169-185.
Solomon et al., 1991, Science 254, 1153-1160.
Tepper, R.I. und Mule, J.J., 1994, Human Gene Therapy
5, 153.
Tkachuk et al., 1992, Cell 71, 691-700.
Tschiersch et al., 1994, Embo J. 13 (16), 3822-3831.
Vile, R. und Russel S., 1994, Gene Therapy 1, 88.
Zatloukal, K., Schmidt, W., Cotten, M., Wagner, E.,
Stingl, G. und Birnstiel, M.L., 1993, Gene 135,
199.

Patentansprüche

1. DNA-Moleküle, enthaltend eine für ein Chromatinregulator-Protein, das eine SET-Domäne aufweist, kodierende Sequenz oder eine Teilsequenz davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in Fig. 6, Fig. 7 oder Fig. 8 dargestellte Nukleotidsequenz, kodierend für *EZH2*, *SUV39H* oder *EZH1*, einschließlich ihrer degenerierten Varianten sowie Mutanten davon, enthalten.
2. DNA-Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine cDNA ist.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es humanen Ursprungs ist.
4. cDNA nach Anspruch 3 der Bezeichnung *EZH2*.
5. cDNA nach Anspruch 3 der Bezeichnung *SUV39H*.
6. DNA-Molekül nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es die für die SET-Domäne von *EZH2* kodierende Region oder einen Abschnitt davon enthält.
7. DNA-Molekül nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es die für die SET-Domäne *SUV39H* kodierende Region oder einen Abschnitt davon enthält.
8. DNA-Molekül nach Anspruch 4, dadurch daß es für eine dominant-negative Mutante von *EZH2* kodiert.

9. DNA-Molekül nach Anspruch 4, dadurch daß es für eine dominant-negative Mutante von *SUV39H* kodiert..
10. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend eine in Anspruch 2 definierte cDNA, funktionell verbunden mit Expressionskontrollsequenzen, zur Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen.
11. Prokaryotische oder eukaryotische Wirtsorganismen, transformiert mit rekombinanter DNA nach Anspruch 10.
12. Rekombinantes humanes Chromatinregulator-Protein *EZH2* oder ein Abschnitt davon, erhältlich durch Expression einer in Anspruch 4 definierten cDNA.
13. Rekombinantes humanes Chromatinregulator-Protein *SUV39H* oder ein Abschnitt davon, erhältlich durch Expression einer in Anspruch 5 definierten cDNA.
14. Antikörper gegen *EZH2*.
15. Antikörper gegen *SUV39H*.
16. Antisense(desoxy)ribonukleotide mit Komplementarität zu einer Teilsequenz einer in Anspruch 1 definierten DNA.
17. DNA-Molekül, kodierend für die SET-Domäne eines Chromatinregulator-Gens, bzw. für einen Abschnitt davon, zur Behandlung und Diagnose von Erkrankungen des Menschen, die auf eine

Deregulation von Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, zurückzuführen sind.

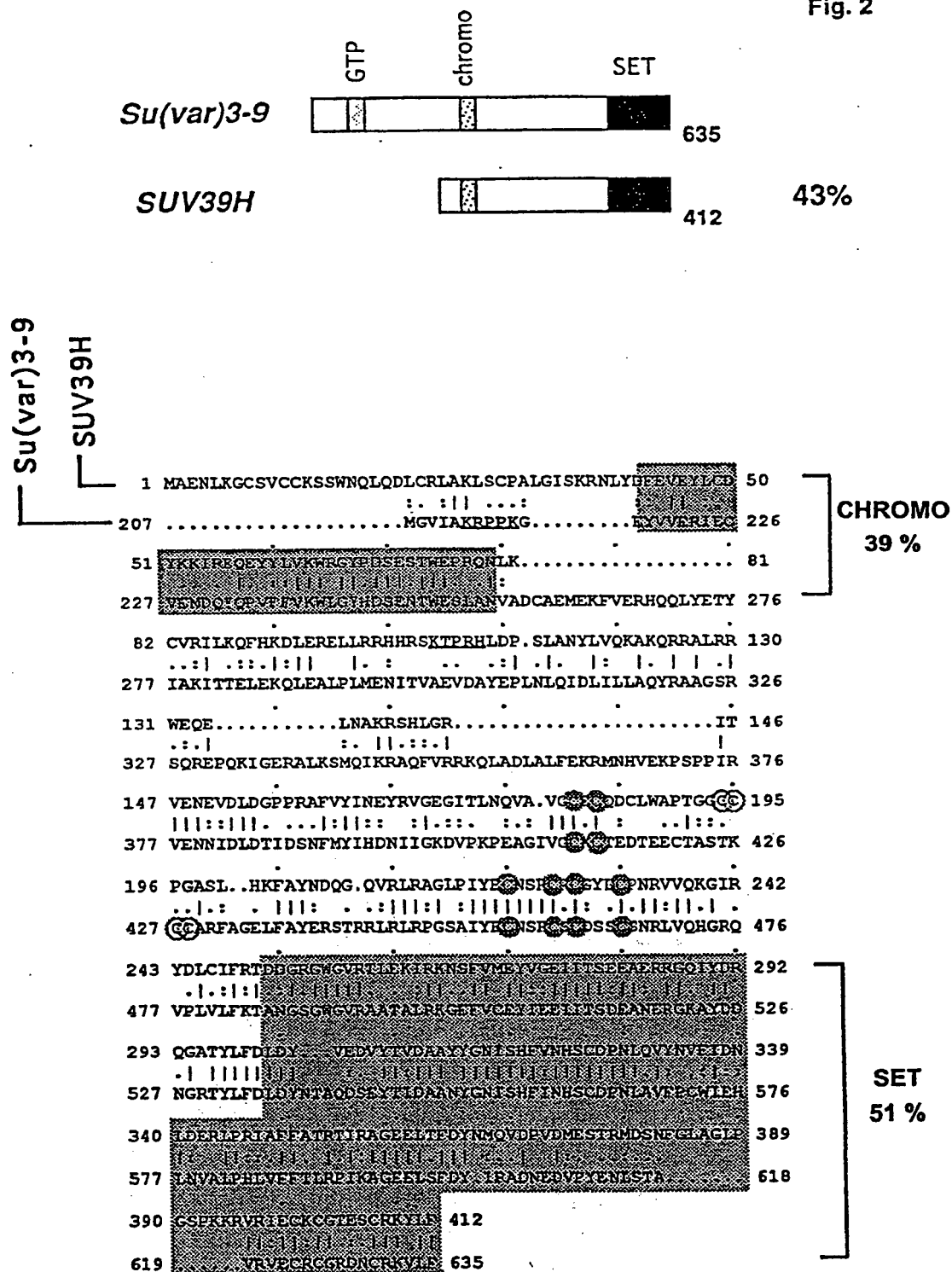
18. DNA-Molekül nach Anspruch 6 oder 7 zur Behandlung und Diagnose von Erkrankungen des Menschen, die auf eine Deregulation von Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, zurückzuführen sind.
19. Antikörper nach Anspruch 14 oder 15 zur Behandlung und Diagnose von Erkrankungen des Menschen, die auf eine Deregulation von Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, zurückzuführen sind.
20. Transgene Maus, enthaltend ein Transgen für die Expression eines Chromatinregulator-Gens, das eine SET-Domäne aufweist, oder einer mutierten Version eines solchen Proteins.
21. Knock-out Maus, erhältlich aus embryonalen Stammzellen, in denen die endogenen Maus-Loci für *Ezh1* und *Suv39h* durch homologe Rekombination unterbrochen wurden.
22. Verfahren zum Identifizieren von Säugetier-Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, oder mutierten Versionen davon, dadurch gekennzeichnet, daß man Säugetier-cDNA- oder genomische DNA-Bibliotheken unter Bedingungen niedriger Stringenz mit einem DNA-Molekül, kodierend für die SET-Domäne oder einen Abschnitt davon, hybridisiert.

Fig. 1

C-reich
75%

SET
88%

Fig. 2



ABERRANTE TRANSKRIPTTE

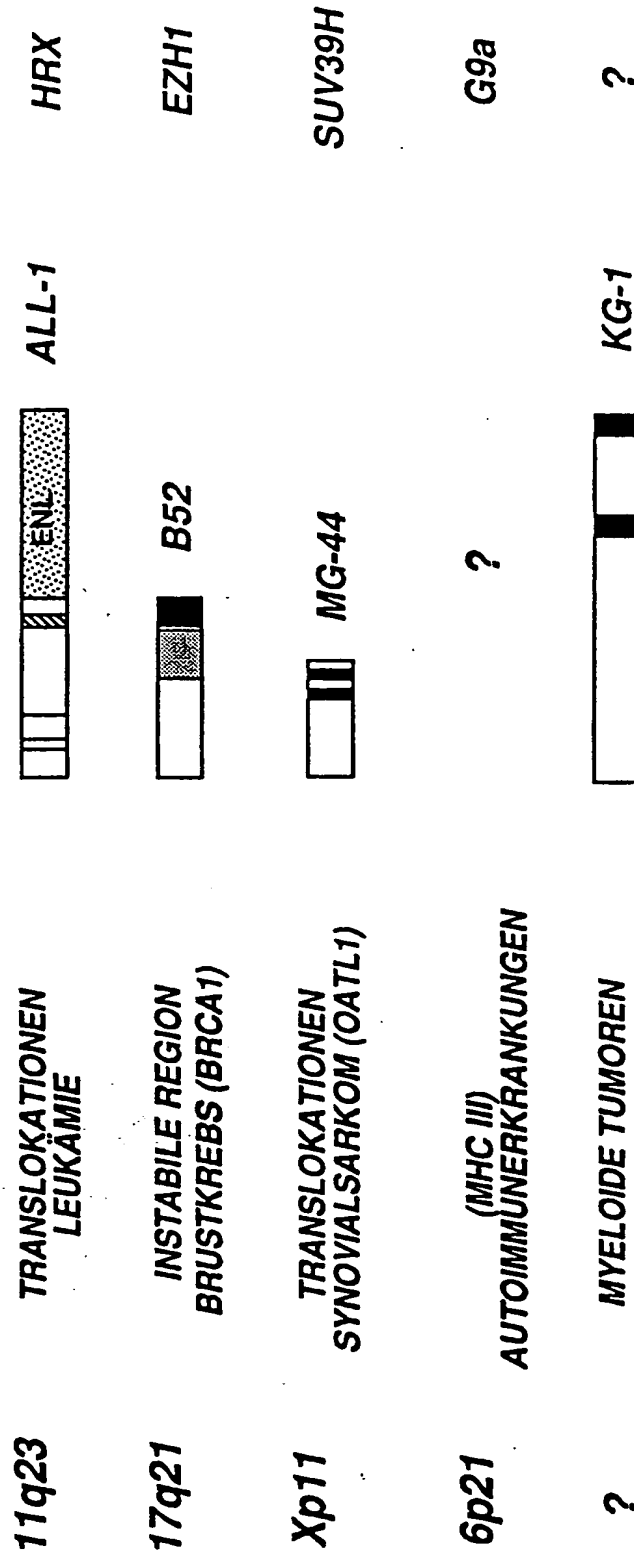




Fig. 3

Fig. 4


SET PROTEIN FAMILIE

S. CEREVISIAE *YHR119*  1080

C. ELEGANS *C26E6.10*  739

DROSOPHILA M.

trx  3751


E(z)  760


Su(var)3-9  635

SET

HUMAN

HRX  3969 46%

EZH2  746 61%

SUV39H  412 43%

G9a  1001

HMG-1

?

Fig. 5

E(z)	SDIAGWGIFL	KEGAQKNEFI	SEYCGEIIISQ	DEADRRGKVV	DK..YMCSFL	50
EZH2	SDVAGWGIFI	KDPVQKNEFI	SEYCGEIIISQ	DEADRRGKVV	DK..YMCSFL	
HRX	SPIHGRGLFC	KRNIDAGEMV	IEYAGNVIRS	IQTDKREKYY	DSKGIG.CYM	
trx	SHIHGRGLYC	TKDIEAGEMV	IEYAGELIRS	TLTDKREERY	DSRGIG.CYM	
C26	SRIHGWGLYA	MESIAPDEMI	VEYIGQTIRS	LVAEEREKAY	ERRGIGSSYL	
YHR	SAIHNWGLYA	LDSIAAKEMI	IEYVGERTRQ	PVAEMREKRY	LKNGIGSSYL	
Su3-9	ANGSGWGVRA	ATALRKGEFV	CEYIEEIIIS	DEANERGKAY	DDNG..RTYL	
SUV39H	DDGRGWGVRT	LEKIRKNSFV	MEYVGEIITS	EAAERRGQTY	DRQG..ATYL	
G9a	TAKMGWGVRA	LQTIPOGTFI	CEYVGEIISD	AEAD...V...	.RED..DSYL	
KG-1	TQNKGWGIRC	LDDIAKGSFV	CIYAGKIITD	DFADKEGL..	.EMG..DEYF	

E(z)	FNLN.....	NDFVVDATRK	GNKIRFANHS	INPNCYAKVM	MVTGDH....	100
EZH2	FNLN.....	NDFVVDATRK	GNKIRFANHS	VNPNCYAKVM	MVNGDH....	
HRX	FRID.....	DSEVVDA TMH	GNRAREINHS	CEPNCYSRVI	NIDGQK....	
trx	FKID.....	DNLVVDA TMR	GNAAREINHC	CEPNCYSKVV	DILGHK....	
C26	FRID.....	LHHVIDATKR	GNFAREINHS	QCPNCYAKVL	TIEGEK....	
YHR	FRVD.....	ENTVIDATKK	GGIAREINHC	CDPNC TAKII	KVGGR....	
Su3-9	FDLDYNTAQD	SEYTIDAANY	GNISHEINHS	CDPNLAVFPC	WIEHLNVALP	
SUV39H	FDLDY...VE	DVYTVDAAYY	GNISHEVNHS	CDPNLQVYV	FIDNLDRLP	
G9a	FDLDNK..DG	EVYCIDARYY	GNISREINHL	CDPNIIIPVRV	FMLHQDLRFP	
KG-1	ANLDHI..ES	VEYIIDAKLE	GNLGRYLNHS	CSPNLFVQNV	FVDTHDLRFP	

Δ

E(z)	RIGIFAKRAI	QPGEELFFDY	..RYGPTEQL	K.....FVGI	EREMEIV*	150
EZH2	RIGIFAKRAI	QTGEELFFDY	..RYSQADAL	K.....YVGI	EREMEIP*	
HRX	HIVIFAMRKE	YRGEELTYDY	..KFPIE.DA	SNKLPCNCGA	KKCRKFLN*	
trx	HLIIFAVRRI	VQGEELTYDY	..KFPFE.D.	EKIPCSGGS	KRCRKYLN*	
C26	RIVIVSRTHI	KKGEELTYDY	..KFPIE...	DDKIDCLCGA	KTCRGYLN*	
YHR	RIVIVALRDI	AASEELTYDY	..KFEREKDD	EERLPCLCGA	PNCKGFLN*	
Su3-9	HLVFTTLRPI	KAGEELSFDY	.IRADNEDVP	YENLSTA...	
SUV39H	RIAFFATRTI	RAGEELTFDY	NMQVDPVDME	STRMDSNFG	AGLPGSPKKR	
G9a	RIAFFESSDI	RTGEELGFDY	GDRFW..DIK	SKYFTCQCGS	EKCKHSAEAI	
KG-1	WVAFTASKRI	RAGTELTWDY	NYEVG..SVE	GKELLCCCGA	IECR.....	

E(z)
EZH2

HRX
trx
26
YHR

Su3-9	VRVECRGGRD	NCRKVL*
SUV39H	VRIECKGTE	SCRKYL*
G9a	ALEQSRLARL	DPHPELLPEL GSLPPVNT*
KG-1GRLL*	

Fig. 6/1

EZH2 Länge: 2600bp (kodierend: 90 - 2330)

1 AGGCAGTGGAGCCCCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGGGCGACGCGCGGGGAACAACG 60
61 CGAGTCGGCGCGCGGGACGAAGAATAATCATGGGCCAGACTGGGAAGAAATCTGAGAAGG 120
M G Q T G K K S E K G
121 GACCAGTTTGTGGCGGAAGCGTGTAATAATCAGAGTACATGCGACTGAGACAGCTCAAGA 180
P V C W R K R V K S E Y M R L R Q L K R
181 GGTTCAGACGAGCTGATGAAGTAAAGAGTATGTTTAGTTCCAATCGTCAGAAAATTTTGG 240
F R R A D E V K S M F S S N R Q K I L E
241 AAAGAACGGAATCTTAAACCAAGAATGGAACAGCGAAGGATACAGCCTGTGCACATCC 300
R T E I L N Q E W K Q R R I Q P V H I L
301 TGACTTCTGTGAGCTCATTGCGCGGGACTAGGGAGTGTTCGGTGACCAGTGACTTGGATT 360
T S V S S L R G T R E C S V T S D L D F
361 TTCCAACACAAGTCATCCCATTAAAGACTCTGAATGCAGTTGCTTCAGTACCCATAATGT 420
P T Q V I P L K T L N A V A S V P I M Y
421 ATTCTTGGTCTCCCCTACAGCAGAATTTTATGGTGGAAGATGAACTGTTTACATAACA 480
S W S P L Q Q N F M V E D E T V L H N I
481 TTCCTTATATGGGAGATGAAGTTTATAGATCAGGATGGTACTTTCATTGAAGAACTAATAA 540
P Y M G D E V L D Q D G T F I E E L I K
541 AAAATTATGATGGGAAAGTACACGGGGATAGAGAATGTGGGTTTATAAATGATGAATTT 600
N Y D G K V H G D R E C G F I N D E I F
601 TTGTGGAGTTGGTGAATGCCCTTGGTCAATATAATGATGATGACGATGATGATGATGGAG 660
V E L V N A L G Q Y N D D D D D D D G D
661 ACGATCCTGAAGAAAGAGAAGAAAAGCAGAAAGATCTGGAGGATCACCGAGATGATAAG 720
D P E E R E E K Q K D L E D H R D D K E
721 AAAGCCGCCACCTCGGAAATTTCTTCTGATAAAATTTTGAAGCCATTTCCTCAATGT 780
S R P P R K F P S D K I F E A I S S M F
781 TTCCAGATAAGGGCACAGCAGAAGAACTAAAGGAAAAATATAAGAACTCACCGAACAGC 840
P D K G T A E E L K E K Y K E L T E Q Q
841 AGTCCCAGGCGCACTTCTCTCTGAATGTACCCCCAACATAGATGGACCAATGCTAAAT 900
L P G A L P P E C T P N I D G P N A K S
901 CTGTTTCAGAGAGAGCAAAGCTTACACTCCTTTCATACGCTTTTCTGTAGGCGATGTTTAA 960
V Q R E Q S L H S F H T L F C R R C F K
961 AATATGACTGCTTCTACATCCTTTTCATGCAACACCCCAACACTTATAAGCGGAAGAACA 1020
Y D C F L H P F H A T P N T Y K R K N T
1021 CAGAAACAGCTCTAGACAACAAACCTTGTGGACCACAGTGTTACCAGCATTGTGGAGGGAG 1080
E T A L D N K P C G P Q C Y Q H L E G A
1081 CAAAGGAGTTTGTCTGCTCTCACCCTGAGCGGATAAAGACCCACCAAAACGTCCAG 1140
K E F A A A L T A E R I K T P P K R P G

Fig. 6/2

```

1141 GAGGCCG CAGAAGAGGACGGCTTCCCAATAACAGTAGCAGGCCAGCACCCCCACCATTA 1200
      G R R R G R L P N N S S R P S T P T I N
1201 ATGTGCTGGAATCAAAGGATACAGACAGTGATAGGGAAGCAGGGACTGAAACGGGGGGAG 1260
      V L E S K D T D S D R E A G T E T G G E
1261 AGAACAATGATAAAGAAGAAGAAGAAGAAGATGAAACTTCGAGCTCCTCTGAAGCAA 1320
      N N D K E E E E K K D E T S S S S E A N
1321 ATTCTCGGTGTCAAACACCAATAAAGATGAAGCCAAATATTGAACCTCCTGAGAATGTGG 1380
      S R C Q T P I K M K P N I E P P E N V E
1381 AGTGGAGTGGTGCTGAAGCCTCAATGTTTAGAGTCTCATTGGCACTTACTATGACAATT 1440
      W S G A E A S M F R V L I G T Y Y D N F
1441 TCTGTGCCATTGCTAGGTTAATTGGGACCAAAACATGTAGACAGGTGTATGAGTTTAGAG 1500
      C A I A R L I G T K T C R Q V Y E F R V
1501 TCAAAGAATCTAGCATCATAGCTCCAGCTCCCGCTGAGGATGTGGATACTCCTCCAAGGA 1560
      K E S S I I A P A P A E D V D T P P R K
1561 AAAAGAAGAGGAAACACCGGTTGTGGGCTGCACACTGCAGAAAGATACAGCTGAAAAAGG 1620
      K K R K H R L W A A H C R K I Q L K K D
1621 ACGGCTCCTCTAACCATGTTTACAACCTATCAACCCTGTGATCATCCACGGCAGCCTTGTG 1680
      G S S N H V Y N Y Q P C D H P R Q P C D
1681 ACAGTTCGTGCCCTTGTGTGATAGCACAAAATTTTGTGAAAAGTTTGTCAATGTAGTT 1740
      S S C P C V I A Q N F C E K F C Q C S S
1741 CAGAGTGTCAAACCGCTTTCCGGGATGCCGCTGCAAAGCACAGTGCAACACCAAGCAGT 1800
      E C Q N R F P G C R C K A Q C N T K Q C
1801 GCCCGTGCTACCTGGCTGTCCGAGAGTGTGACCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGAGCCG 1860
      P C Y L A V R E C D P D L C L T C G A A
1861 CTGACCATTGGGACAGTAAAAATGTGTCTGCAAGAACTGCAGTATTGACGGGGGCTCCA 1920
      D H W D S K N V S C K N C S I Q R G S K
1921 AAAAGCATCTATTGCTGGCACCATCTGACGTGGCAGGCTGGGGGATTTTATCAAAGATC 1980
      K H L L L A P S D V A G W G I F I K D P
1981 CTGTGCAGAAAAATGAATTCATCTCAGAATACTGTGGAGAGATTATTTCTCAAGATGAAG 2040
      V Q K N E F I S E Y C G E I I S Q D E A
2041 CTGACAGAAGAGGGAAAGTGATGATAAATACATGTGCAGCTTCTGTTCAACTTGAACA 2100
      D R R G K V Y D K Y M C S F L F N L N N
2101 ATGATTTTGTGGTGGATGCAACCCGCAAGGGTAACAAAATTCGTTTGCAAATCATTCGG 2160
      D F V V D A T R K G N K I R F A N H S V
2161 TAAATCCAAACTGCTATGCAAAAGTTATGATGGTTAACGGTGATCACAGGATAGGTATTT 2220
      N P N C Y A K V M M V N G D H R I G I F
2221 TTGCCAAGAGAGCCATCCAGACTGGCGAAGAGCTGTTTTTGATTACAGATACAGCCAGG 2280
      A K R A I Q T G E E L F F D Y R Y S Q A

```

Fig. 6/3

2281 CTGATGCCCTGAAGTATGTCGGCATCGAAAGAGAAATGGAAATCCCTTGACATCTGCTAC 2340
D A L K Y V G I E R E M E I P *
2341 CTCCTCCCCCTCCTCTGAAACAGCTGCCTTAGCTTCAGGAACCTCGAGTACTGTGGGCAA 2400
2401 TTTAGAAAAAGAACATGCAGTTTGAATTCTGAATTTGCAAAGTACTGTAAGAATAATTT 2460
2461 ATAGTAATGAGTTTAAAAATCAACTTTTTATTGCCTTCTCACCAGCTGCAAAGTGTTTTG 2520
2521 TACCAGTGAATTTTTCATAATGCAGTATGGTACATTTTCAACTTTGAATAAAGAATA 2580
2581 CTTGAACCTGTCAAAAAAAA 2600

Fig. 7/1

SUV39H Länge: 2732 bp (kodierend: 45 - 1284)

1 TCGCGAGGCCGCTAGGCCCGAATGTCGTTAGCCGTGGGGAAAGATGGCGGAAAATTTAA 60
M A E N L K

61 AAGGCTGCAGCGTGTGTTGCAAGTCTTCTTGAATCAGCTGCAGGACCTGTGCCGCCTGG 120
G C S V C C K S S W N Q L Q D L C R L A

121 CCAAGCTCTCCTGCCCTGCCCTCGGTATCTCTAAGAGGAACCTCTATGACTTTGAAGTCG 180
K L S C P A L G I S K R N L Y D F E V E

181 AGTACCTGTGCGATTACAAGAAGATCCGCGAACAGGAATATTACCTGGTGAAATGGCGTG 240
Y L C D Y K K I R E Q E Y Y L V K W R G

241 GATATCCAGACTCAGAGAGCACCTGGGAGCCACGGCAGAATCTCAAGTGTGTGCGTATCC 300
Y P D S E S T W E P R Q N L K C V R I L

301 TCAAGCAGTTCCACAAGGACTTAGAAAGGGAGCTGCTCCGGCGGCACCACCGGTCAAAGA 360
K Q F H K D L E R E L L R R H H R S K T

361 CCCCCCGGCACCTGGACCCAAGCTTGGCCAACTACCTGGTGCAGAAGGCCAAGCAGAGGC 420
P R H L D P S L A N Y L V Q K A K Q R R

421 GGGCGCTCCGTGCTGGGAGCAGGAGCTCAATGCCAAGCGCAGCCATCTGGGACGCATCA 480
A L R R W E Q E L N A K R S H L G R I T

481 CTGTAGAGAATGAGGTGGACCTGGACGGCCCTCCGCGGGCCTTCGTGTACATCAATGAGT 540
V E N E V D L D G P P R A F V Y I N E Y

541 ACCGTGTTGGTGAGGGCATCACCTCAACCAGGTGGCTGTGGGCTGCGAGTGCCAGGACT 600
R V G E G I T L N Q V A V G C E C Q D C

601 GTCTGTGGGCACCCACTGGAGGCTGCTGCCCGGGGGCGTCACTGCACAAGTTTGCCTACA 660
L W A P T G G C C P G A S L H K F A Y N

661 ATGACCAGGGCCAGGTGCGGCTTCGAGCCGGGCTGCCCATCTACGAGTGCAACTCCCGCT 720
D Q G Q V R L R A G L P I Y E C N S R C

721 GCCGCTGCGGCTATGACTGCCCAAATCGTGTGTACAGAAGGGTATCCGATATGACCTCT 780
R C G Y D C P N R V V Q K G I R Y D L C

781 GCATCTTCCGGACGGATGATGGGCGTGGCTGGGGCGTCCGCACCCTGGAGAAGATTGCA 840
I F R T D D G R G W G V R T L E K I R K

841 AGAACAGCTTCGTGATGGAGTACGTGGGAGAGATCATTACCTCAGAGGAGGCAGAGCGGC 900
N S F V M E Y V G E I I T S E E A E R R

901 GGGGCCAGATCTACGACCGTCAGGGCGCCACCTACCTCTTGACCTGGACTACGTGGAGG 960
G Q I Y D R Q G A T Y L F D L D Y V E D

961 ACGTGTACACCGTGGATGCCGCTACTATGGCAACATCTCCCACTTTGTCAACCACAGTT 1020
V Y T V D A A Y Y G N I S H F V N H S C

1021 GTGACCCCAACCTGCAGGTGTACAACGTCTTCATAGACAACCTTGACGAGCGGCTGCCCC 1080
D P N L Q V Y N V F I D N L D E R L P R

1081 GCATCGCTTTCTTTGCCACAAGAACCATCCGGGCAGGCGAGGAGCTCACCTTTGATTACA 1140
I A F F A T R T I R A G E E L T F D Y N

Fig. 7/2

1141 ACATGCAAGTGGACCCCGTGGACATGGAGAGCACCCGCATGGACTCCAACCTTTGGCCTGG 1200
M Q V D P V D M E S T R M D S N F G L A
1201 CTGGGCTCCCTGGCTCCCTAAGAAAGCGGTCCGTATTGAATGCAAGTGTGGGACTGAGT 1260
G L P G S P K K R V R I E C K C G T E S
1261 CCTGCCGCAAATACCTCTTCTAGCCCTTAGAAGTCTGAGGCCAGACTGACTGAGGGGGCC 1320
C R K Y L F *
1321 TGAAGCTACATGCACCTCCCCACTGCTGCCCTCCTGTCGAGAATGACTGCCAGGGCCTC 1380
1381 GCCTGCCTCCACCTGCCCCACCTGCTCCTACCTGCTCTACGTTTCAGGGCTGTGGCCGTG 1440
1441 GTGAGGACCGACTCCAGGAGTCCCTTTCCCTGTCCCAGCCCCATCTGTGGGTGCACTT 1500
1501 ACAAACCCCAACCCACCTTCAGAAATAGTTTTTCAACATCAAGACTCTCTGTGCTTGGGA 1560
1561 TTCATGGCCTATTAAGGAGGTCCAAGGGGTGAGTCCCAACCCAGCCCCAGAATATATTG 1620
1621 TTTTGCACCTGCTTCTGCCTGGAGATTGAGGGGTCTGCTGCAGGCCTCCTCCCTGCTGC 1680
1681 CCCAAAGGTATGGGGAAGCAACCCCAAGCAGGCAGACATCAGAGGCCAGAGTGCCTAGC 1740
1741 CCGACATGAAGCTGGTTCCCCAACACAGAACTTTGTACTAGTGAAGAAAGGGGTCCC 1800
1801 TGGCCTACGGGCTGAGGCTGGTTTCTGCTCGTGCTTACAGTGTGGGTAGTGTGGCCCT 1860
1861 AAGAGCTGTAGGGTCTCTTCTTCAGGGCTGCATATCTGAGAAGTGGATGCCACATGCCA 1920
1921 CTGGAAGGGAAGTGGGTGTCCATGGGCCACTGAGCAGTGAGAGGAAGGCAGTGCAGAGCT 1980
1981 GGCCAGCCCTGGAGGTAGGCTGGGACCAAGCTCTGCCTTCACAGTGCAGTGAAGGTACCT 2040
2041 AGGGCTCTTGGGAGCTCTGCGGTGCTAGGGGCCCTGACCTGGGGTGTGATGACCGCTGA 2100
2101 CACCACTCAGAGCTGGAACCAAGATCTAGATAGTCCGTAGATAGCACTTAGGACAAGAAT 2160
2161 GTGCATTGATGGGGTGGTGATGAGGTGCCAGGCACTAGGTAGAGCACCTGGTCCACGTGG 2220
2221 ATTGTCTCAGGGAAGCCTTGAAAACCAAGGAGGTGGATGCCAGGAAAGGGCCCATGTGGC 2280
2281 AGAAGGCAAAGTACAGGCCAAGAATTGGGGGTGGGGAGATGGCTTCCCCACTATGGGAT 2340
2341 GACGAGGCGAGAGGGAAGCCCTTGCTGCCTGCCATTCCCAGACCCAGCCCTTTGTGCTC 2400
2401 ACCCTGGTTCCACTGGTCTCAAAAGTCACCTGCCTACAAATGTACAAAAGGCGAAGGTTT 2460
2461 TGATGGCTGCCTTGCTCCTTGCTCCCCACCCCTGTGAGGACTTCTCTAGGAAGTCCTT 2520
2521 CCTGACTACCTGTGCCAGAGTGCCCTACATGAGACTGTATGCCCTGCTATCAGATGCC 2580
2581 AGATCTATGTGTCTGTGTGTGTCCATCCCGCGGCCCCCAGACTAACCTCCAGGCAT 2640
2641 GGACTGAATCTGGTTCTCCTCTGTACACCCCTCAACCCTATGCAGCCTGGAGTGGGCAT 2700
2701 CAATAAAATGAACTGTCGACTGAAAAA 2732

Fig. 8

EZH2 — 1844 TCTTACTTGTGGAGCCGCTGACCATTGGGACAGTAAAAATGTGTCCTGCA 1893
 || || ||||| || | || || ||||| | || || ||||| |
 EZH1 — 1 ACTCACCTGTGGGGCCTCAGAGCACTGGGACTGCAAGGTGGTTTCCTGTA 50
 1894 AGAACTGCAGTATTCAGCGGGGCTCCAAAAAGCATCTATTGCTGGCACC 1943
 | ||||| || ||||| || || ||||| || ||||| || ||||| ||
 51 AAACTGCAGCATCCAGCGTGGACTTAAGAAGCACCTGCTGCTGGCCCCC 100
 1944 TCTGACGTGGCAGGCTGGGGGATTTTATCAAAGATCCTGTGCAGAAAA 1993
 ||||| ||||| || ||||| | || || || || || ||||| || ||
 101 TCTGATGTGGCCGGATGGGGCACCTTCATAAAGGAGTCTGTGCAGAAGAA 150
 B52
 1994 TGAATTCATCTCAGAATACTGTGGAGAGATTATTTCTCAAGATGAAGCTG 2043
 ||||| || ||||| ||||| || || || || || ||||| || |||||
 151 CGAATTCATTCTGAATACTGTGGTGAGCTCATCTCTCAGGATGAGGCTG 200
 ▽
 2044 ACAGAAGAGGGAAAGTGTATGATAAATACATGTGCAGCTTTCTGTTCAAC 2093
 | || | || || || ||||| ||||| ||||| || ||||| || |||||
 201 ATCGACGCGGAAAGGTCTATGACAAATACATGTCCAGCTTCCTCTTCAAC 250
 2094 TTGAACAATGATTTTGTGGTGGATGCAACCCGCAAGGGTAACAAAATTCG 2143
 | || ||||| ||||| ||||| || || || || ||||| || |||||
 251 CTCAATAATGATTTTGTAGTGGATGCTACTCGGAAAGGAAACAAAATTCG 300
 2144 TTTTGCAAATCATTCCGTAATCCAACTGCTATGCAAAGTT . ATGAT 2191
 ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| || |||||
 301 ATTTGCAAATCATTGAGTGAATCCCACTGTTATGCCAAAGGTGAGTCCC 350
 2192 GGTAAACGGTGATCACAGGATAGGTATTTTGGCAAGAGAGCCATCCAGA 2241
 || | | || || || || || || || || || || || || || || ||
 351 AGTAACCTGGGAGGTGGGGTGGGGGATGGATGCCTCTTTACTGTGATTTC 400
 2242 CTGGCGAAGAGCTGTTTTTGTATTACAGATACAGCCAGGCTGATGCCCTG 2291
 | || | || || || || || || || || || || || || || || ||
 401 CATTGTTGTTGAACATTTTCCTTAGCTGAGCTATCTTTTGTCCAAAGAT 450
 2292 AAGTATGTCGGCATCGAAAGAGAAATGGAATCCCTTGA * 2330
 || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
 451 AATCATGATTAATATCTGGTATCATTTTAGGCCCTCTC 489

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)